



Ministero dell'Università e della Ricerca

Direzione Generale per il Coordinamento, la Promozione e la Valorizzazione della Ricerca - Ufficio V

Rendiconto di spesa Fondi 5 per mille ANNO 2019
Enti della Ricerca Scientifica

Contributo percepito € 60.264,57

In data 02.10.2020

Denominazione Ente: FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Codice fiscale: 04724150968

Sede legale: Via Francesco Sforza 28 - 20122 MILANO

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: protocollo@policlinico.mi.it

Dati del rappresentante legale: Dott. Ezio Belleri *

TITOLO DEL PROGETTO: VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROTETTIVO DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI (MSCS), DEGLI OLIGOSACCARIDI DEL LATTE UMANO (HMO) E DELLE MATRICI FERMENTATE (MF) IN UN MODELLO MURINO DI ENTEROCOLITE NECROTIZZANTE (NEC)

Data di inizio progetto: 01.07.2021

Data di fine progetto: 30.06.2023

**Fondi 5 per mille assegnati
al progetto:**

€ 60.264,57

Di cui:

**Quota sostenuta entro l'anno di
rendicontazione: € 0**

**Quota accantonata, da sostenere
per progetti pluriennali (durata
massima tre anni): € 60.264,57**

VOCI DI SPESA	Quota sostenuta entro l'anno di rendicontazione	Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)		€ 30.000,00
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		€ 30.264,57

Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		
Elaborazione dati		
Spese amministrative		
Altro (indicare quali)		
TOTALE		€ 60.264,57

Milano, 08 giugno 2021

Il Responsabile del Progetto
Dr.ssa Livia Provitera

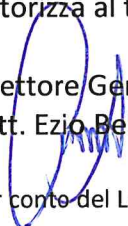


Il Direttore Generale *
Dott. Ezio Belleri



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Generale*
Dott. Ezio Belleri



* (per conto del Legale Rappresentante Arch. Marco Giachetti - Deliberazione Consiliare n. 21 del 30.4.2019)

Titolo	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO PROTETTIVO DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI (MSCS), DEGLI OLIGOSACCARIDI DEL LATTE UMANO (HMO) E DELLE MATRICI FERMENTATE (MF) IN UN MODELLO MURINO DI ENTEROCOLITE NECROTIZZANTE (NEC)
Background e Obiettivo dello studio	L'enterocolite necrotizzante (NEC) è una patologia caratterizzata da ischemia e necrosi dell'intestino tenue che colpisce prevalentemente i neonati prematuri di età gestazionale inferiore alle 36 settimane e di basso peso alla nascita (<1500g) (Lin and Stoll, 2006). Con un'incidenza di circa il 5% nei neonati ricoverati in terapia intensiva neonatale, la NEC rappresenta una delle principali cause di morbidità, associandosi ad una mortalità del 25-30%, che può arrivare fino al 50% nei pazienti sottoposti ad intervento di resezione chirurgica del tratto necrotico. Nonostante diversi fattori predisponenti siano stati identificati, la patogenesi della NEC rimane ancora non del tutto chiara. L'infiammazione intestinale può progredire verso una infezione/infiammazione sistemica, con compromissione multiorgano e morte. Nell'ambito della complessità multifattoriale, l'imaturità della mucosa gastrointestinale, la disbiosi e l'esposizione a nutrienti, sono considerati i principali determinanti della malattia. La terapia medica è di supporto e prevede la somministrazione di antibiotici ad ampio spettro, riposo intestinale, nutrizione per via parenterale, supporto inotropo e ventilatorio (Papillon <i>et al.</i>, 2013; Neu <i>et al.</i>, 2011; Bell <i>et al.</i>, 1978; Lin <i>et al.</i>, 2008; Shah <i>et al.</i>, 2012; Downard <i>et al.</i>, 2012). L'intervento chirurgico è necessario in circa la metà dei casi, per la rimozione della porzione necrotica. (Stey <i>et al.</i>, 2015; Yee <i>et al.</i>, 2012; Stoll <i>et al.</i>, 2010). Nonostante i progressi nelle cure neonatali, solo un paziente su due con NEC chirurgica sopravvive e la maggior parte di questi neonati presenta complicazioni a lungo termine come sindrome dell'intestino corto, ritardo nella crescita e outcome neurocognitivo avverso (Papillon <i>et al.</i>, 2013; Neu <i>et al.</i>, 2011, Henry <i>et al.</i>, 2008, Salhab <i>et al.</i>, 2004; Hintz <i>et al.</i>, 2005). La degenza prolungata e l'aumentato rischio di morte intra-ospedaliera contribuiscono all'impatto negativo della malattia in termini socio-economici (Stey <i>et al.</i>, 2015; Holman <i>et al.</i>, 2006). OBIETTIVI Scopo del presente progetto è quello di individuare possibili strategie preventive e terapeutiche in grado di ridurre i danni intestinali e cerebrali indotti dalla enterocolite necrotizzante in un modello neonatale murino di NEC. Obiettivo primario Valutare l'efficacia nel prevenire lo sviluppo della NEC dei seguenti approcci: • Somministrazione per via intraperitoneale di cellule mesenchimali

	stromali isolate da midollo osseo umano (hBM-MSCs); • Aggiunta di matrici fermentate (post-biotici) al latte di formula; • Aggiunta di oligosaccaridi del latte umano (HMO) al latte di formula. Obiettivo secondario Valutare l'effetto dei differenti approcci, oggetto dell'obiettivo primario, sui danni cerebrali secondari allo sviluppo della NEC.
Materiali e metodi	Gli esperimenti saranno condotti su topi neonati appartenenti al ceppo C57BL/6SnJ di età compresa tra il secondo e sesto giorno di vita (PND – post natal day - 2-6), nati spontaneamente per via vaginale. Protocollo sperimentale L'induzione della NEC avverrà riproducendo un modello neonatale murino di enterocolite necrotizzante modificato rispetto a quello proposto da Tian et al. (Tian et al., 2010). La NEC verrà indotta utilizzando lo schema di trattamento di 72 ore che prevede: - separazione dalla madre a 72 ore di vita (PND3); - alimentazione mediante gavage orogastrico con latte di formula, ogni 3 ore, per un totale di 72 ore, in quantità giornaliere crescenti (PND3: 30µl; PND4: 40 µl; PND5: 50µl); - somministrazione per via orale di LPS dopo 18 ore dalla separazione dalla madre; - cicli di ipossia-ischemia-freddo ogni 12 ore, tramite esposizione per 1 minuto al 100% di azoto (N₂) e 10 minuti a + 4°C. Gli animali verranno ripartiti nei seguenti gruppi: - cellule mesenchimali stromali (hBM-MSCs) - latte materno - NEC + PBS (veicolo in cui sono risospese le cellule mesenchimali stromali) - NEC + hBM-MSCs 500.000 cellule/50µl di PBS - NEC + hBM-MSCs 1.000.000 cellule/50µl di PBS - NEC + C34 (1mg/Kg/die) • matrici fermentate (post-biotici) - latte materno - latte di formula - NEC + maltodestrine (stabilizzanti dei postbiotici) - NEC + postbiotici (due/tre differenti dosi) - NEC + C34 (1mg/Kg/die) • oligosaccaridi del latte umano (HMO) - latte materno - latte di formula - NEC + HMO (due/tre differenti dosi) - NEC + C34 (1mg/Kg/die) I trattamenti, e le relative tempistiche e modalità, cui gli animali

	appartenenti ai vari gruppi saranno sottoposti sono schematicamente riportati in Tabella 1. Al termine delle 72 ore dall'inizio del protocollo di induzione della NEC, gli animali saranno sacrificati mediante decapitazione, si procederà al prelievo dell'intestino e del cervello. Una parte degli organi prelevati verrà conservata e fissata per poter poi essere processata per l'analisi istologica/immunoistochimica e parte sarà congelata a -80°C per successive analisi molecolari.
Parole Chiave	Prematurità, enterocolite necrotizzante, disbiosi, infiammazione
Dati preliminari	Induzione della NEC ed effetto delle cellule mesenchimali stromali (hBM-MSCs) Gli esperimenti condotti per valutare l'efficacia delle cellule mesenchimali stromali isolate da midollo osseo umano (hBM-MSCs) sull'enterocolite necrotizzante hanno permesso di determinare l'efficacia del modello neonatale murino nell'indurre la patologia. L'analisi istologica condotta sugli intestini raccolti e colorati con ematossilina/eosina ha evidenziato (Figure 1 e 2): 1. <u>l'adequatezza del modello nell'indurre la NEC;</u> 2. <u>l'efficacia in maniera dose-dipendente delle hBM-MSCs nel ridurre l'entità della NEC.</u> Nello specifico, gli intestini analizzati istologicamente sono stati considerati positivi per la presenza di NEC in caso di attribuzione di uno score istologico, secondo lo schema proposto da Tian et al. (Tian et al., 2010) uguale o maggiore di 2. Il modello neonatale murino utilizzato si è dimostrato in grado di indurre la NEC nel 66.7% dei casi analizzati rispetto al gruppo di controllo alimentato con solo latte materno, in cui è stata registrata una incidenza pari allo 0% (NEC+PBS vs Latte materno, $p=0.0015$, Mann-Whitney test) (Figura 2). Per quanto riguarda l'effetto dei trattamenti utilizzati al fine di ridurre l'incidenza dell'enterocolite necrotizzante nei gruppi oggetto di studio, il gruppo NEC+hBM-MSCs 500.000 (trattato con la dose inferiore di cellule mesenchimali stromali) ha riportato un'incidenza di NEC pari al 52.5% che, sebbene inferiore rispetto al gruppo non trattato (NEC+PBS), non mostra però una differenza statisticamente significativa. Il gruppo NEC+hBM-MSCs 1.000.000, in cui è stata somministrata la dose maggiore di cellule mesenchimali stromali, è invece risultata in grado di ridurre l'incidenza della NEC in maniera significativa rispetto al controllo non trattato (NEC+PBS) (Gruppo NEC+PBS versus NEC+hBM-MSCs 1.000.000, $p=0.0002$, Mann-Whitney test), riportando un'incidenza del tutto comparabile a quanto ottenuto nel gruppo NEC+C34 (gruppo NEC+PBS versus NEC+C34, $p=0.0004$, Mann-Whitney test), cui è stata somministrata la molecola C34, attualmente l'unica in grado di ridurre la severità della NEC indotta

	sperimentalmente inibendo l'attività del TLR4, sia in vitro che ex-vivo (Neal et al., 2013) (Figure 1 e 2). Entrambi i gruppi NEC+hBM-MSCs 1.000.000 e NEC+C34 hanno riportato un'incidenza della patologia dello 0%, comparabile con quanto riscontrato nel gruppo di controllo alimentato con latte materno (Figure 1 e 2).
Altre Strutture dell'Istituto coinvolte	Dr. Stefano Gatti, Centro di Ricerche Chirurgiche Precliniche Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano
Altri Enti coinvolti	Prof. Maria Ester Bernardo, MD, PhD IRCCS San Raffaele Scientific Institute, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (TIGET) Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation, Milano Prof. Felipe Garrido, MD Clinica Universidad de Navarra - NICU, Department of Pediatrics - Madrid – Spain Prof. Maria Rescigno, MD, PhD Unità di Immunologia delle mucose e Microbiota Humanitas Research Hospital – Pieve Emanuele (Milano)
IRG SS MDC	IRG: DKUS digestive kidney and urological system SS: GMPB Gastrointestinal Mucosal Pathobiology MDC: 06

TIPO DI TRATTAMENTO	QUANTITA' E MODALITA' DI SOMMINISTRAZIONE	TEMPO DI SOMMINISTRAZIONE
Latte di Formula	Somministrato per os mediante gavage in dosi crescenti (PND3, 30µl; PND4, 40µl; PND 5, 50µl)	Somministrato ogni 3 ore a partire dal PND3 per 72 ore
LPS	Disciolto in acqua sterile p.p.i. e somministrato per os alla dose di 3 mg/Kg	Somministrato dopo 18 ore dalla separazione dalla madre
Veicolo (PBS sterile 1X)	50µl somministrati per via i.p.	Somministrato al PND2
Cellule Mesenchimali Staminali (hBM-MSCs)	500.000 – 1.000.000 cellule/50µl di PBS sterile 1X somministrati per via i.p.	Somministrate al PND2
Matrici Fermentate / Postbiotici	Addizionate al latte di formula somministrate per os mediante <i>gavage</i>	Somministrate ogni 3 ore a partire dal PND3 per un totale di 72 ore
Oligosaccaridi del latte umano (HMO)	Addizionati al latte di formula e somministrati per os mediante <i>gavage</i>	Somministrato ogni 3 ore a partire dal PND3 per 72 ore
C34	Risospeso in acqua sterile p.p.i. e somministrato per os alla dose 1 mg/Kg/die	Somministrato una volta al giorno per 3 giorni dal PND3

Tabella 1. Schema dei trattamenti. Per ogni trattamento sono indicate le dosi e le modalità di somministrazione unitamente ai tempi di somministrazione previsti per ognuno di essi.

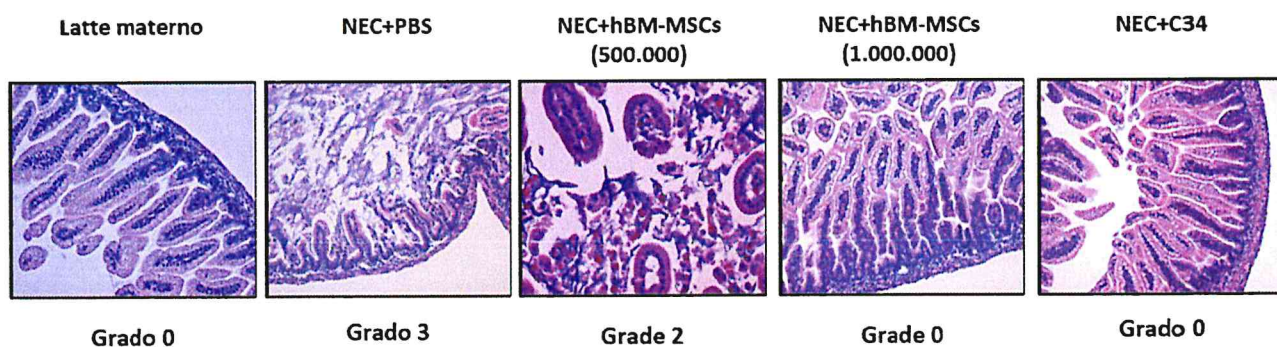


Figura 1. Analisi istologica mediante colorazione con ematossilina/eosina e relativa attribuzione del grado di NEC istologica rilevata.

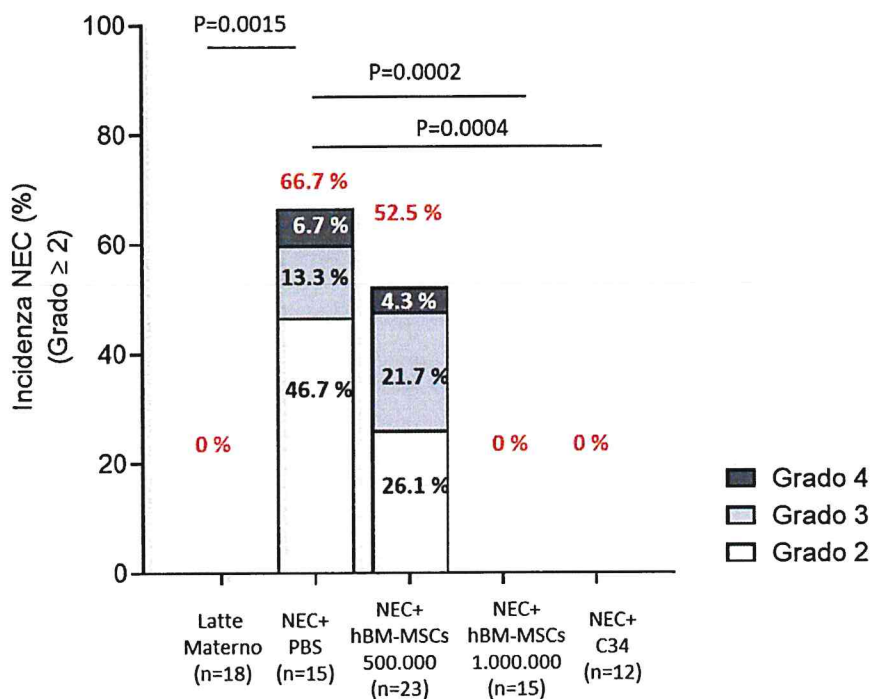


Figura 2 Incidenza della NEC. In rosso è indicata la percentuale assoluta di incidenza della NEC in ciascun gruppo. Per i gruppi NEC+PBS e NEC+hBM-MSCs è indicata la percentuale di incidenza di ogni grado istologico di NEC superiore a 2. Un grado istologico pari o superiore a 2 è stato considerato positivo per la presenza di NEC. Per ciascun gruppo è indicato il numero di intestini analizzati.

Bibliografia

- Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, Brotherton T. (1978) Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg*; 187(1):1-7.
- Downard CD, Renaud E, St Peter SD, Adbullah F, Islam S, Saito JM, Blakely ML, Huang EY, Arca MJ, Cassidy L, Aspelund G. (2012) Treatment of necrotizing enterocolitis: an American Pediatric Surgical Association Outcomes and Clinical Trials Committee systematic review. *J Pediatr Surg*; 47(11):2111-22.
- Henry MCW, Moss RL. (2008) Neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*; 17(2):98-109.
- Hintz SR, Kendrick DE, Stoll BJ, Vohr BR, Fanaroff AA, Donovan EF, Poole WK, Blakely ML, Wright L, Higgings R. (2005) Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*. 115(3):696-703.
- Holman RC, Stoll BJ, Curns AT, Yorita KL, Steiner CA, Schonberger LB. (2006) Necrotising enterocolitis hospitalisations among neonates in the United States. *Paediatr Perinat Epidemiol*;20(6):498-506.
- Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ. (2008) Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin Perinatol*; 32(2):70-82.

- Lin PW, Stoll BJ. (2006) Necrotizing enterocolitis. *Lancet* 368; 1271–1283.
- Neal MD, Jia H, Eyer B, Good M, Guerriero CJ, Sodhi CP, Afrazi A, Prindle T Jr, Ma C, Branca M, Ozolek J, Brodsky JL, Wipf P, Hackam DJ. (2013) Discovery and validation of a new class of small molecule Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors. *PLoS One*. 2013;8(6): e65779.
- Neu J, Walker WA. (2011) Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med*. 364:255-264.
- Papillon S, Castle SL, Gayer CP, Ford HR. (2013) Necrotizing enterocolitis: contemporary management and outcomes. *Adv Pediatr*. 60:263-279.
- Salhab WA, Perlman JM, Silver L, Sue Broyles R. (2004) Necrotizing Enterocolitis and neurodevelopmental outcome in extremely low birth weight infants < 100 g. *J Perinatol*. 24: 534-540.
- Shah TA, Meinzen-Derr J, Gratton T, Steichen J, Donovan EF, Yolton K, Alexander B, Narendran V, Schibler KR. (2012) Hospital and neurodevelopmental outcomes of extremely low-birth-weight infants with necrotizing enterocolitis and spontaneous intestinal perforation. *J Perinatol*;32(7):552-8.
- Stey A et al. (2015) Outcomes and costs of surgical treatments of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 135:e1190-1197.
- Stoll BJ et al. (2010) Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 126:443-456.
- Tian R, Liu SXL, Williams C, Soltau TD, Dimmitt R, Zheng X, De Plaen IG. (2010) Characterization of necrotizing enterocolitis model in newborn mice. *Int J Clin Exp Med*;3(4):293-302.
- Yee WH et al. (2012) Incidence and timing of presentation of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Pediatrics*. 129: e298-e304.